

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRÍTO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E DA SAÚDE – CCENS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

DÉBORA CRISTINA GONÇALVES

EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.) COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E CARVACROL NA INCIDÊNCIA DA MURCHA DE *Fusarium* EM MUDAS

ALEGRE-ES

2018

DÉBORA CRISTINA GONÇALVES

EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.) COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E CARVACROL NA INCIDÊNCIA DA MURCHA DE *Fusarium* EM MUDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Agroquímica, na linha de pesquisa em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz

ALEGRE-ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecária: Lizzie de Almeida Chaves – CRB-6 ES-000871/O

G635e Gonçalves, Débora Cristina, 1993-
Efeito do tratamento de sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) com óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e carvacrol na incidência da murcha de *Fusarium* em mudas / Débora Cristina Gonçalves. – 2018.
53 f. : il.

Orientador: Vagner Tebaldi de Queiroz.
Coorientadores: Adilson Vidal Costa ; Willian Bucker Maraes.
Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde.

1. Tomate. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. Sementes – Doenças. I. Queiroz, Vagner Tebaldi de. II. Costa, Adilson Vidal. III. Maraes, Willian Bucker. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. V. Título.

CDU: 631.41

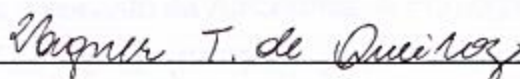
DÉBORA CRISTINA GONÇALVES

EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.) COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E CARVACROL NA INCIDÊNCIA DA MURCHA DE *Fusarium* EM MUDAS

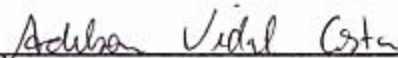
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Agroquímica, na linha de pesquisa em Química Orgânica.

Aprovada em 23 de 02 de 2018

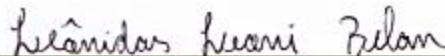
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr. Adilson Vidal Costa
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador



Pesquisador Dr. Leônidas Leoni Belan
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fiel em tudo, e principalmente à Sagrada Família que, na ausência de minha família, me acolheu e cuidou em todos os momentos mais difíceis nesses dois anos.

À minha família linda que me suportou em todos os momentos de estresse, desespero e alegrias. Obrigada a vocês pelo amor incondicional e por vibrarem por mim a cada vitória. EU AMO VOCÊS.

Agradeço ao meu orientador, professor Vagner Tebaldi de Queiroz, que possibilitou a realização deste sonho juntamente com os professores Willian Bucker de Moraes e Adilson Vidal Costa.

O que dizer de meus amigos? Aqueles velhos de guerra e os conquistados no decorrer do mestrado! Obrigada! É a palavra mais sincera que dou a vocês. Amigos que me ensinavam disciplinas de Química (Talita, Carol e Aldino), amigo companheiro de trabalho (Wilker), amigos que torciam junto (Família Rastro de Luz), sem vocês nada teria sido possível.

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo pela infraestrutura disponível, ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) e equipe do Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas Agrícolas (LEMP), pela paciência em ensinar a uma Bióloga o encanto da Agronomia. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelo financiamento da pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da bolsa de estudos.

*“Frágil ser humano sou eu.
Filho dependente sou eu.
Toda riqueza em mim é Deus
Toda sorte em mim é Deus”*
Junior Maciel e Josias Teixeira

RESUMO

GONÇALVES, DÉBORA CRISTINA. **EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATEIRO** (*Solanum lycopersicum* L.) **COM ÓLEO ESSENCIAL DE** *Origanum vulgare* L. **E CARVACROL NA INCIDÊNCIA DA MURCHA DE Fusarium EM MUDAS. 2018. 53p.** Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

O tomateiro pode ser cultivado em várias regiões devido à aceitabilidade da cultura a diferentes tipos de clima. Todavia, a cultura é suscetível a uma série de doenças que acarreta na redução da produção e produtividade, dentre as quais se destaca a murcha de *Fusarium* causada pelo agente etiológico *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. O plantio de cultivares resistentes tem se mostrado eficiente contra as raças 1 e 2 desse patógeno, entretanto o surgimento da raça 3 tem comprometido a eficiência do controle genético. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial uso do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e do carvacrol no tratamento de sementes visando inibir a incidência da murcha de *Fusarium* em mudas de tomateiro. O O. *vulgare* L. e o carvacrol foram caracterizados por CG-DIC e CG-EM. Nos testes *in vitro*, o OE de O. *vulgare* L. (50, 85, 140, 240 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o carvacrol (50, 85, 140, 240 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram avaliados para determinar as concentrações efetivas mínimas para inibir 50 e 100% (CE_{50} e CE_{100}) do crescimento micelial do patógeno. Os testes de fitotoxicidade com o OE O. *vulgare* L. e com o carvacrol foram realizados em sementes de tomateiro. Ensaios *in vivo* foram realizados em casa de vegetação com sementes tratadas com o OE de O. *vulgare* L. e do carvacrol nas concentrações de 100, 200, 400, 600, 1.200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, onde foram avaliadas as variáveis índice de velocidade de emergência (IVE), altura das mudas de tomateiro e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os componentes majoritários do OE de O. *vulgare* L. foram carvacrol (67,67%), o-cimeno (11,60%) e timol (3,91%). Nos testes *in vitro* o OE de O. *vulgare* L. e o carvacrol inibiram 100% de PIC nas concentrações de 400 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O OE de O. *vulgare* L. apresentou ação fungicida contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o carvacrol apresentou efeito fungistático em todas as concentrações testadas (200-1.000). As CE_{50} e CE_{100} para o OE de orégano foram 134,5 e 323 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o carvacrol 62,6 e 166 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Não houve fitotoxidez nas sementes nem em plântulas de tomateiro. Para os testes *in vivo*, o OE de O. *vulgare* L. e o carvacrol não apresentaram diferença significativa entre os

dois; porém houve diferença entre as concentrações, à medida em que as concentrações foram aumentando, a incidência da doença diminuía. A AACPD foi reduzida em 68% na concentração de 1.200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto, o OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol podem ser uma alternativa para o tratamento de sementes de tomateiro, e fazer parte de um programa de manejo integrado da murcha de *Fusarium* em mudas de tomateiro.

Palavras-chave: óleo volátil. controle alternativo. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

ABSTRACT

GONÇALVES, DÉBORA CRISTINA. **EFFECT OF THE TREATMENT TOMATO SEEDS (*Solanum lycopersicum* L.) WITH ESSENTIAL OIL OF *Origanum vulgare* L. AND CARVACROL IN THE INCIDENCE OF *Fusarium* WILT IN PLANTS. 2018. 53p.** Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

Tomato plants can be grown in several regions of the world due to its adaptability to different climate types. This crop is susceptible to a series of diseases that reduce the tomato production, among them *Fusarium* wilt stands out as one of the most important. Although the use of resistant cultivars has shown to be effective against races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, the same was not observed against race 3. Once the use of resistant cultivars is not completely efficient, it is necessary to search for other alternatives to control *Fusarium* wilt. Thus the effect of the essential oil of *Origanum vulgare* L. and carvacrol in the treatment of seeds in order to inhibit the incidence of *Fusarium* wilt in tomato plants was carried out. *O. vulgare* L. essential oil and carvacrol were characterized by GC-FID and GC-MS. In vitro tests were performed for *O. vulgare* L. essential oil at 50, 85, 140, 240 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and carvacrol at 50, 85, 140, 240 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to determine EC50 and EC100 values for *F. oxysporum*. Phytotoxicity tests with *O. vulgare* L. essential oil and carvacrol were carried out on tomato seeds. In vivo assays were performed in a greenhouse with seeds treated with *O. vulgare* L. essential oil and carvacrol at 100, 200, 400, 600 and 1,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to evaluate emergency velocity index (EVI), height of tomato seedlings and the area below the disease progress curve (AACPD). The major components of *O. vulgare* L. essential oil were carvacrol (67.67%), o-cymene (11.60%) and thymol (3.91%). *O. vulgare* L. essential oil showed a fungicidal action against *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* at 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ while carvacrol showed a fungistatic between 200 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The EC50 and EC100 values for *O. vulgare* L. essential oil were 134.5 and 323 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and for carvacrol 62.6 and 166 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Neither seeds nor tomato seedlings show phytotoxicity after treated with *O. vulgare* L. essential oil or the carvacrol. AACPD was reduced by 68% when *O. vulgare* L. essential oil or carvacrol were used at 1,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This finding highlights the potential use of *O. vulgare* L. essential oil and carvacrol as an alternative to the treatment of tomato seeds, and be part of an integrated management program of *Fusarium* wilt in tomato seedlings.

Keywords: volatile oil. alternative control. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 - Efeito do óleo essencial de o <i>Origanum vulgare</i> L. e do carvacrol na redução da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plântulas de tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	40

LISTA DE ABREVEATURAS

AACPD – Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença

ATP – Adenosina Trifosfato

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

CG-DIC - Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização em Chamas

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

CM – Crescimento Micelial

CPA – Crescimento da Parte Aérea

CR – Crescimento Radicular

ESP – Esporulação

IVE – Índice de Velocidade de Emergência

IVG – Índice de Velocidade de Germinação

LDE – Limiar de Dano Econômico

MID – Manejo Integrado de Doenças

NAS - *National Academy of Science*

NUDEMAFI – Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo

Fitossanitário de Pragas e Doenças

OE – Óleo Essencial

PC – Primeira Contagem

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIC – Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial

PN – Plântulas Normais

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
<p>Tabela 1 - Tempo de retenção (T_R), valores de índice de Kovats tabelado (IK_{tab}) e calculado (IK_{cal}) e porcentagem em área (%) dos constituintes químicos do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.....</p>	36
<p>Tabela 2 - Modelos de equações de regressão linear obtidos a partir da avaliação do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. e carvacrol contra o crescimento micelial <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> em meio BDA.....</p>	37
<p>Tabela 3 - Efeito do tratamento de sementes de tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) com óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L., carvacrol e o fungicida comercial (tiabendazol) na redução da incidência da murcha de <i>Fusarium</i> e altura das plântulas.....</p>	39

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Cultura do tomateiro	18
2.1.1 Doenças	18
2.1.1.1 Murcha de Fusarium	19
2.2 Manejo integrado de doenças	20
2.2.1 Tratamento de sementes	21
3 REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 1	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Materiais	31
2.2 Caracterização química	31
2.3 Testes <i>in vitro</i>	32
2.3.1 Ensaio de atividade antifúngica	32
2.3.2 Avaliação do efeito fitotóxico	33
2.4 Efeito <i>in vivo</i> na incidência de murcha de Fusarium	34
2.4.1 Tratamento das sementes	34
2.4.2 Infestação do solo com patógeno	34
2.4.3 Avaliação	35
2.5 Análise estatística	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Caracterização química do óleo essencial	35
3.2 Efeito antifúngico <i>in vitro</i>	37
3.3 Avaliação do efeito fitotóxico	38
3.4 Controle da murcha de Fusarium em plântulas de tomateiro com o óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. e carvacrol	38
3 REFERÊNCIAS	41
APÊNDICES	44
APÊNDICE A – Análise de variância do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L. para a variável porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC).	45
APÊNDICE B – Análise de variância do carvacrol para a variável porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC).	46
APÊNDICE C - Análise de variância do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L. para as variáveis primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G), número de plântulas normais	

(PN), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA)..... 47

APÊNDICE D - Análise de variância do carvacrol para as variáveis primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G), número de plântulas normais (PN), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA). 50

APÊNDICE E - Análise de variância para o óleo essencial de *O. vulgare* L. e o carvacrol para as variáveis, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice de velocidade de emergência (IVE) e altura das plântulas. 53

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais consumidas no mundo. Isso se deve à grande aceitabilidade no consumo da fruta tanto *in natura* quanto na forma processada. Em função disso é cultivado em várias regiões do mundo incluindo o Brasil, classificado em nono lugar no *ranking* dos dez países que mais produzem tomate (AZABOU et al., 2016; FAOSTAT, 2016; MORAIS, 2017).

A cultura do tomateiro é suscetível a diversas doenças que podem limitar sua produção, dentre essas, destaca-se a murcha de Fusarium causada pelo agente etiológico *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (CEPEA, 2014; KUROSZAWA & PAVAN, 2005). No Brasil, esse patógeno pode ser encontrado nas áreas de cultivo de todo país, uma vez que habita o solo na forma de uma estrutura de resistência denominada clamidósporo (AMORIM et al, 2016)

O controle químico para a murcha de Fusarium não é efetivo, tornando-o economicamente inviável. Dessa forma, o controle da doença tem sido realizado com o plantio de cultivares resistentes (LOPES & ÁVILA, 2005). O controle genético tem se mostrado eficiente, porém apresenta falhas em função da possibilidade de o patógeno suplantar essa resistência (AMORIN; REZENDE & BERGAMIN FILHO, 2011). Nesse contexto, o manejo integrado de doenças de plantas (MID) é baseado em medidas preventivas que atuam na redução do inóculo inicial (exclusão e erradicação) (KIMATI et al., 2005). Dentre essas medidas, encontra-se o tratamento de sementes. O plantio de sementes saudáveis, de qualidade e devidamente tratadas protege as sementes durante o processo germinativo e emergência bem como as plântulas durante o desenvolvimento inicial (ABATI; BRZEZINSKI & HENNING, 2013).

Em virtude das limitações no manejo da doença, a busca por medidas de controle alternativas, como uso de produtos naturais derivados de plantas aromáticas, tem sido alvo de estudos (AMARAL & BARA, 2005; LOPES & ÁVILA, 2005; AMORIN; REZENDE & BERGAMIN FILHO, 2011; GARCIA et al., 2012; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013). Entre esses produtos naturais, os óleos essenciais (OEs) destacam-se por apresentarem a função de atuar na proteção das plantas contra microrganismos, incluindo os fitopatogênicos (SÃO PEDRO et al., 2013). Plantas aromáticas como o orégano (*Origanum vulgare* L.) são utilizadas pela medicina popular como

antissépticas por apresentarem OE com propriedades antibacteriana e antifúngica (JAAFARI et al., 2007; PINTO et al., 2007). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial uso do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e do carvacrol no tratamento de sementes visando inibir a incidência da murcha de Fusarium em mudas de tomateiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas no mundo em virtude da possibilidade de cultivo em diversos tipos de climas e o consumo do fruto que pode ser tanto *in natura* quanto processado. (MORAIS 2017; ABCSEM, 2011).

A produção mundial de tomate no ano de 2017 foi de 170,8 milhões de toneladas, sendo a China o principal produtor de tomate, retendo 31% da produção total da fruta, seguida da Índia (10%) e Estados Unidos (7%), em nono lugar encontra-se o Brasil representando 4,3 % da produção (FAOSTAT, 2017; IBGE, 2017a).

O Brasil produziu, no ano de 2017, 4.337.047 toneladas de tomate, sendo as regiões sudeste e centro-oeste as principais produtoras com representação de 44,84% e 29,66 % da produção nacional, respectivamente. Os estados com maior produção de tomate foram Goiás com 1,2 milhões de toneladas (28,8%), São Paulo com 938 mil toneladas (21,4%) e Minas Gerais com 676 mil toneladas (15,4%). O Espírito Santo participou com 164 mil toneladas (3,7%) na produção nacional (IBGE, 2017b). Além de movimentar a economia brasileira, no ano de 2014 o cultivo do tomateiro empregou cerca de 3 milhões de trabalhadores diretos e indiretos, potencializando sua atividade no setor agropecuário do país (FERRAZ CARVALHO et al., 2014).

2.1.1. Doenças

A cultura do tomateiro é suscetível a uma série de fatores que podem limitar a sua produção. Dentre esses fatores, encontram-se as doenças de origem biótica: relacionadas a agentes infecciosos como fungos, bactérias, vírus e nematoides que podem ser transmitidos de uma planta a outra; e abiótica: causadas por fatores desfavoráveis ao ambiente como pH, deficiência nutricional e estresse hídrico, não podendo ser transmitido de uma planta a outra (AMORIM; REZENDE & BERGAMIN

FILHO, 2011). Essas doenças são responsáveis por reduzirem a produtividade e a qualidade do produto comercial (LOPES & REIS, 2011).

As doenças que mais reduzem a produção de tomate são as de origem biótica causadas por bactérias (Cancro bacteriano, Mancha bacteriana, Pinta-bacteriana, Murcha bacteriana, Talo oco e Podridão mole dos frutos), vírus (Viroses do complexo do vira-cabeça do tomateiro, Risca do tomateiro e mosaico, Topo-amarelo e Amarelo-baixeiro, Geminiviroses) e fungos (Mancha de estenfílio, Mela de rizoctonia, Murcha de Fusarium, Murcha de verticílio, Pinta-preta, Podridão de esclerócio, Podridão de esclerotínia, Requeima, Septoriose). Dentre essas doenças que acometem a lavoura de tomate, destaca-se a murcha de Fusarium (LAPIDUS, 2013; AMORIM et al, 2016).

2.1.1.1. Murcha de Fusarium

A murcha de Fusarium é causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*; é uma doença que atinge, praticamente, todas as áreas no Brasil onde o tomateiro é cultivado. A infecção por esse patógeno pode levar à queda prematura dos frutos e à perda total do tecido vegetal. A influência da doença na cultura está relacionada com a redução da produtividade e da qualidade do produto a ser comercializado (SILVA et al., 2006).

O agente etiológico *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* é um patógeno com capacidade de sobreviver em restos culturais e no solo, sendo considerado de difícil controle em virtude da produção de estruturas de resistência denominadas clamidósporo, as quais promove viabilidade e estabilidade de suas funções por aproximadamente 10 anos, mesmo em ambientes desfavoráveis à sua reprodução, dificultando, assim, o manejo da doença (AMORIM et al., 2016).

Esse agente etiológico ocorre em três raças fisiológicas (1, 2 e 3), as quais são classificadas segundo a forma de infectar e causar a doença em cultivares contendo diferentes *loci* de resistência (ROCHA & MOURA, 2013). Reis et al. (2004), descreveram que no Brasil as raças 1 e 2 ocorrem em praticamente todas as áreas de cultivo da hortalíça, enquanto que a raça 3 é encontrada em poucas regiões, sendo relatada primeiramente no Estado do Espírito Santo e, posteriormente, Rio de Janeiro e Nordeste (REIS et al., 2005; REIS & BOITEUX, 2007; BARBOZA et al., 2013).

A infecção por *F. oxysporum* ocorre quando a planta apresenta algum tipo de ferimento na raiz. Nessa ocasião, as hifas infectam e colonizam os tecidos vasculares da planta promovendo o entupimento do sistema vascular. Após a infecção, a planta começa a manifestar os sintomas da doença, caracterizados pelo amarelecimento das folhas mais velhas para as mais novas, seguido da murcha e morte da planta, os quais são visíveis em reboleiras na lavoura (LOPES & REIS, 2007). A ocorrência e o desenvolvimento da doença são favorecidos em temperatura entre 21 e 31 °C, solos ácidos (pH abaixo de 6) e com baixo teor de nutrientes essenciais para o desenvolvimento da planta, sementes contaminadas, implementos agrícolas infestados com o patógeno, vento e água corrente em áreas contaminadas (AMORIM et al., 2016).

2.2. Manejo integrado de doenças

O manejo integrado de doenças (MID) consiste na identificação do patógeno (diagnose), monitoramento da área (tomada de decisão) e na aplicação de técnicas de manejo ajustáveis a cada doença (AMORIM et al., 2016). Segundo a *National Academy of Science* (NAS) (1969) o MID consiste na “utilização de todas as técnicas disponíveis dentro de um programa unificado de tal modo a manter a população de organismos nocivos abaixo do Limiar de Dano Econômico (LDE) e a minimizar os efeitos colaterais deletérios ao ambiente”. Essas técnicas são baseadas nos princípios de Whetzel (1925) que se encontram a seguir:

- a) A exclusão e a erradicação são medidas que atuam principalmente na redução do inóculo inicial impedindo a entrada do patógeno na área de cultivo. A erradicação atua sobre a sobrevivência do patógeno e a exclusão sobre a disseminação do patógeno.
- b) Nos casos em que o patógeno já está na área de cultivo aplicam-se as medidas de proteção, imunização e terapia, que visam à proteção do hospedeiro em relação ao patógeno; e a evasão com a escolha de áreas de cultivo desfavoráveis ao patógeno.

A medida de controle que tem se mostrado eficiente para a murcha de *Fusarium* é o plantio de cultivares resistentes (AMORIM et al., 2016). Essa medida atua sobre o hospedeiro com o princípio da imunização (promover resistência à planta); porém, em função da possibilidade de o patógeno suplantar essa resistência, a medida torna-se falha (AMORIM; REZENDE & BERGAMIN FILHO, 2011). Dessa forma, as associações de outras formas de controle preventivo devem ser integradas ao controle genético, como a correção do pH, a rotação de culturas, a desinfestação de implementos agrícolas, adequada drenagem da água de regiões infestadas para áreas saudas, controle do trânsito de operários e animais entre as áreas de cultivo infestadas e saudas, eliminação dos restos culturais e o tratamento de sementes (LOPES & SANTOS, 1994; KIMATI et al., 2005).

2.2.1. Tratamento de sementes

O tratamento de sementes é essencial para evitar a introdução de patógenos nas áreas de cultivo e proteger as sementes e as plântulas nas fases iniciais de desenvolvimento (PEREIRA et al., 2015). Associado ao controle genético, a redução do inóculo inicial em sementes representa uma medida de controle do MID (BARROCAS & MACHADO, 2010; AMORIM et al., 2016).

Para tal, é fundamental conhecer as formas de interação entre os fitopatógenos e as sementes. As três formas de os microrganismos serem transportados via semente são (BRASIL, 2009):

- Os microrganismos encontram-se em mistura com as sementes, tornando-os parte da fração impura do lote. Essa parte impura do lote é representada por fragmentos vegetais, semente de plantas invasoras e partículas de solo, que podem ser portadoras de micélio dormente, corpos frutíferos e esporos de fungos, cistos ou galhas de nematoides, células bacterianas e partículas de vírus, comprometendo todo o lote de sementes a ser plantado;
- Os microrganismos podem se associar às sementes por meio de adesão à sua superfície, infestando-as;

- Os microrganismos podem ainda associar-se aos tecidos das sementes, tanto em estruturas superficiais quanto em estruturas internas no embrião, infectando-os;

O objetivo do tratamento de sementes é assegurar a qualidade sanitária das mesmas, via aplicações de produtos químicos para a desinfestação, desinfecção e proteção destas contra patógenos, especialmente para aqueles fungos que se associam às sementes ou que já se encontram no solo (ABATI; BRZEZINSKI & HENNING, 2013). Para alguns patógenos de solo, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp., que causam podridão e a morte de sementes e plântulas, o tratamento de sementes com produtos químicos é uma prática eficiente (PEREIRA et al., 2015).

É importante salientar que o inóculo associado às sementes está diretamente relacionado com a transmissão da doença para as áreas de cultivo (MORAES & MENTEN, 2006) e dependendo do patógeno, pode causar problemas radiculares e tombamentos em algumas espécies de plantas (LAZAROTTO et al., 2012). Além de abrigar e transportar patógenos, o inóculo pode reduzir a qualidade das sementes no período de armazenamento (PEREIRA et al., 2015).

Neste contexto, Pereira et al. (2015), descreveram que os óleos essenciais oriundos de plantas aromáticas podem se tornar uma alternativa no tratamento de sementes de hortaliças. A utilização de produtos de origem natural no controle de doenças de plantas foi regulamentada pela Lei nº10.831, de 23 de dezembro de 2003, em sistemas de produção orgânicos e agroecológicos (BRASIL, 2003).

Os OEs são constituídos por uma gama de compostos químicos e a interação entre os mesmos confere ao OE atividade antimicrobiana (NALLATHAMBI et al., 2009). Assim, o OE de orégano (*Origanum vulgare* L.; Lamiaceae,) vem sendo utilizado no controle de fitopatógenos como *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *Fusarium* sp., (DAFERERA et al., 2003; VIUDA-MARTOS et al, 2007; LOPEZ-REYES et al., 2010). O OE de orégano é constituído por vários compostos químicos, dentre os quais se encontra o cavacrol (principal constituinte), eficiente na inibição do crescimento micelial de *Neofabraea alba* em maçãs (NERI et al., 2009).

3. REFERÊNCIAS

ABATI, J.; BRZEZINSKI, C. R.; HENNING, A. A.; Grandes Culturas Cultivar: Semente tratada. **Revista Cultivar**, nº 173 p. 30-32, outubro de 2013.

ABCSEM – **Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas**. Tomate lidera crescimento e lucratividade do setor de hortaliças. Disponível em: < <http://www.abcsem.com.br/releases/284/tomate-lidera-crescimento-e-lucratividade-no-setor-de-hortalicas->>. Acesso em: 06/04/2017.

AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F.; Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos; **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento** Vol 2 (2), 5- 8, 2005.

AMORIM, L. et al.. **Manual de fitopatologia**- Princípios e Conceitos, 4º ed. vol. 1, São Paulo 2011.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 5 ed., 2016.

ANDRADE, D.E.G.T.; SOUZA, L.T.; ASSIM, T.C.; **Murcha-de-fusário: importante doença do tomateiro no estado de Pernambuco**; Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 5 e 6, p.243-263, 2008-2009.

AZABOU, Samia et al. Potential of the solid-state fermentation of tomato by products by *Fusarium solani* pisi for enzymatic extraction of lycopene. **LWT-Food Science and Technology**, v. 68, p. 280-287, 2016.

BARBOZA, E. A. et al. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in Northeast Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 3, p. 422-422, 2013.

BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C. Introdução a patologia de sementes e testes convencionais de sanidade de sementes para a detecção de fungos fitopatogênicos. **Informativo Abrates**, v. 20, p. 74-75, 2010.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 dez. 2003. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/lei-no-10-831-de-23-de-dezembro-de-2003.pdf/view>> Acesso em: 20 de ul 2017.

FERRAZ CARVALHO, Carla Roberta et al. Viabilidade econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci/RJ, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 12, 2014.

CEPEA – **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada**; Hortifruti Brasil – Anuário 2014/2015; Ed. Especial, Ano 13 – nº 141, Dez. 2014 e Jan. 2015.

COLLINS, C.H., BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; Fundamentos de Cromatografia – Campinas, SP: **Editora da Unicamp**, 2006.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations and Statistics: **Production Crops**. Dez/2017. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> >. Acesso em 18 jan. 2018.

GARCIA, R.A. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012.

GRUENWALD J, BRENDLER T; JAENICKE C. PDR for Herbal Medicines. **Medical Economic Co.Inc.**, Montvale, N.J, 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; **Rendimento médio, por ano da safra e produto**; fevereiro de 2017a.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA**; Rio de Janeiro v.30 n.1 p.1-81,janeiro de 2017b.

JAAFARI, A. et al. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 477-491, 2007.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Volume 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, 666p, 2005.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.P. Doenças do tomateiro. In: Kimati, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, p. 607– 626, 2005.

LAPIDUS, G. A. **Progresso temporal da murcha de fusário em tomateiro sob diferentes disponibilidades de água no solo**. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade de Brasília pelo programa de pós-graduação em Fitopatologia. Brasília, p. 71, 2013.

LAZAROTTO, Marília et al. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedreia fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, 2012.

LOPES, C.A. & REIS, A. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Circular técnica - EMBRAPA**, 2ª ed., Brasília, 17p, 2011.

LOPES, C.A. & ÁVILA, A.C. Doenças do tomateiro. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, 2005.

LOPEZ-REYES, J.G. et al. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 3, p. 171-177, 2010.

MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Transmission of *Alternaria* spp. by common bean seeds and its effects on physiological quality. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.4, p.381-383, 2006.

MORAIS, T.B., **Eficiência de doses de nitrogênio e sombreamento na cultura do tomate em cultivo protegido**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Santa Maria – RS, Santa Maria, p. 1-78, 2017.

NALLATHAMBI, P. et al. Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations. **Crop Protection**, v. 28, n. 6, p. 525-532, 2009.

NAS - National Academy of Sciences. Cultural control. In: **Insect Pest Management and Control**, Nat, Acad. Sci., Washington DC, pp. 208-242, 1969.

NERI, Fiorella et al. Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. **Postharvest biology and technology**, v. 51, n. 3, p. 425-430, 2009.

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G. et al. Fungitoxic effect of essential oil from aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI) on *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 1, p. 150-157, 2013.

PEREIRA, R.B. et al. Tratamento de sementes de Hortaliças – Circular Técnica 140; **Embrapa**, mar/2015.

PINTO, E. et al. In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 2, p. 135-141, 2007.

REIS, Ailton et al. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 4, 2004.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Surto de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em campos comerciais de tomate do mercado fresco no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Horticultura Brasileira**, 25, pp. 451 – 454, 2007.

REIS, A. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 426-428, 2005.

ROCHA, D.J.A.; MOURA, A.B. Biological control of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by rhizobacteria. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 423-430, 2013.

SÃO PEDRO, A. et al. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. **Microbial Pathogens and Strategies**

for Combating Them (Méndez-Vilas, A., ed.) Formatex Research Center Publisher, v. 2, p. 1364-1374, 2013.

SILVA, J.B.C. et al. Cultivo do tomate para industrialização. 2003. 2011.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. **Journal of Food Safety**, v. 27, n. 1, p. 91-101, 2007.

WHETZEL, H. et al. Laboratory outlines in plant pathology. **Philadelphia: W. B. Saunders**, p. 231, 1925.

CAPÍTULO 1

EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.) COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. E CARVACROL NA INCIDÊNCIA DA MURCHA DE *Fusarium* EM MUDAS

Débora Cristina Gonçalves^{a*}, Wilker Pinheiro Lima^a, Vagner Tebaldi de Queiroz^a, Adilson Vidal Costa^a, Willian Bucker Moraes^{a,b}, Leônidas Leoni Belan^b, Guilherme de Resende Camara^b, Jhon Lennon Silva Garbe^b

^a Universidade Federal do Espírito Santo/ UFES, Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Alto Universitário, s/n, 29.500-000, Alegre, ES, Brasil; binhamg20@gmail.com, wilker_plima@hotmail.com, vagnertq@gmail.com, avcosta@hotmail.com, willian.fito@gmail.com.

^b Universidade Federal do Espírito Santo/ UFES, Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças, Alto Universitário, s/n, 29.500-000, Alegre, ES, Brasil; willian.fito@gmail.com, leonidas_agronomia@yahoo.com.br, grcamara@hotmail.com, jhonlennon.garbe@gmail.com.

RESUMO: O tomate é uma das hortaliças mais consumidas no mundo, entretanto é susceptível a uma diversidade de doenças. Dentre essas, a murcha de *Fusarium* se destaca em função das perdas ocasionadas à tomaticultura. O controle dessa doença tem sido realizado com o plantio de cultivares resistentes, porém a utilização dessa técnica isolada não tem se mostrado totalmente eficiente a longo prazo. Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito do óleo essencial (OE) de *Origanum vulgare* L. e do carvacrol no tratamento de sementes para proporcionar inibição máxima da incidência da murcha de *Fusarium* em mudas de tomateiro. O OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol foram caracterizados por CG-DIC e CG-EM. A partir dos testes *in vitro* foram determinados os valores de CE₅₀ e CE₁₀₀ para o OE de *O. vulgare* L. e para o carvacrol, respectivamente, bem como os valores de concentração desses produtos naturais não fitotóxicos às sementes de tomateiro. Nos ensaios *in vivo*, em casa de vegetação, verificou-se a influência do tratamento das sementes no índice de velocidade de emergência (IVE), na altura das plântulas, e nos valores da área abaixo da curva de

progresso da doença (AACPD). Nos testes *in vitro* houve inibição de 100% do crescimento micelial na concentração de 400 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o OE *O. vulgare* L. e o carvacrol, respectivamente. O OE de *O. vulgare* L. demonstrou ação fungicida a partir da concentração de 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o carvacrol apresentou apenas efeito fungistático em todas as concentrações testadas. Os valores de CE_{100} para o OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol foram 323 e 166 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Não foi observado fitotoxidez nas sementes nem em plântulas de tomateiro para quaisquer das concentrações testadas. Para os testes *in vivo*, a AACPD foi reduzida em 68% tanto para o OE de *O. vulgare* L. quanto para o carvacrol a 1.200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto, o OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol podem ser uma alternativa para o tratamento de sementes de tomateiro, e vir a ser avaliado como parte de um programa de manejo integrado da murcha de Fusarium em mudas de tomateiro.

Palavras-chave: AACPD. Fitotoxidez. *O. vulgare* L. .

1. Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça consumida em todo mundo devido à aceitabilidade do fruto tanto *in natura* quanto processado (LA TORRE et al., 2016). Cerca de 170 milhões de toneladas de tomate foram produzidas no ano de 2017, sendo a China o principal produtor (31%), seguida pela Índia (10%), Estados Unidos (7%) e, em nono lugar o Brasil representando 4,3 % da produção mundial (FAOSTAT, 2017; IBGE, 2017).

A cultura do tomateiro é suscetível a diversas doenças que podem limitar a sua produção. Dentre essas, destaca-se a murcha de Fusarium, causada pelo agente etiológico denominado *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Os sintomas dessa doença iniciam-se com o amarelecimento das folhas mais velhas até atingir as mais jovens seguido pela murcha e morte da planta, ocasionando uma redução da produtividade do tomateiro (AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, 2016).

Devido à capacidade do *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. em se manter no solo, na forma clamidósporo, o manejo mais apropriado dessa doença tem sido o plantio

de cultivares resistentes (AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, 2016). Todavia, o surgimento de novas raças desse patógeno tem dificultado o manejo da doença devido ao número restrito de cultivares resistentes às mesmas (BARBOZA et al., 2013). Em virtude disso, faz-se necessário a implementação de programa de manejo integrado de doenças (MID) dispondo de medidas preventivas que atuam na redução do inóculo inicial, dentre essas, o tratamento de sementes. Esse processo reduz a infestação de patógenos, protege as sementes durante a germinação e emergência, bem como as plântulas durante o desenvolvimento inicial (DU TOIT, 2004; MANCINI; ROMANAZZI, 2014).

No tratamento convencional de sementes geralmente são utilizados fungicidas sintéticos. Entretanto, trabalhos de pesquisa com óleos essenciais (OEs) vêm sendo realizados para avaliar seu potencial uso no manejo de doenças ocasionadas por fungos fitopatogênicos (GOGGI et al., 2008; HILLEN et al., 2012; KOTAN et al., 2013; LA TORRE et al., 2016; TOMAZONI et al., 2017). A motivação para esses estudos justifica-se pelo crescente número de agentes fitopatogênicos resistentes ao modelo de manejo convencional. Sendo assim, a utilização desses compostos naturais integrados ao MID representa uma alternativa para o manejo de doenças transmitidas via sementes e solo (MANCINI; ROMANAZZI, 2014)

Plantas como o orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae) contêm OE que apresenta atividade antibacteriana e antifúngica (JAAFARI et al., 2007; PINTO et al., 2007). Essas atividades são conferidas ao OE de orégano devido às diferentes substâncias químicas presentes em sua composição. Dentre essas, os compostos majoritários, o carvacrol e o timol possuem atividade antimicrobiana comprovada (VIANA, 2013). Assim, o objetivo com este estudo foi avaliar o efeito do OE de orégano e do carvacrol no tratamento de sementes visando proporcionar redução da incidência da murcha de *Fusarium* em mudas de tomateiro.

2. Material e Métodos

2.1. Materiais

O óleo essencial (OE) de orégano (*Origanum vulgare* L.) (Quinarí: Lote BJ611049), o carvacrol (Sigma-Aldrich: Lote #MKBTO467V), o surfactante Tween 80® e o solvente DMSO (Vetec), o fungicida comercial contendo tiabendazol (48,5 % (m/v)) registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para o tratamento de sementes de tomate contra *Fusarium oxysporum* e as sementes de tomate da variedade Santa Cruz Kada (Paulista) sem adição de defensivos químicos (ISLA: Lote 104364-007- S2) foram adquiridos comercialmente.

2.2. Caracterização química

O OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol foram caracterizados em cromatógrafo a gás (CG) acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC; Shimadzu; CG-2010 Plus), as condições para a análise foram: coluna capilar de 30m e 0,25mm de diâmetro interno (Rtx-5MS); temperatura da coluna de 60 – 240 °C (3 °C min.⁻¹). As temperaturas do injetor e do detector foram 240 e 250 °C, respectivamente. Uma amostra (10mg) foi diluída em diclorometano (1mL) e, a partir desta solução, foi utilizado 1µL para a injeção. A identificação dos componentes químicos das amostras foi realizada após análise em CG acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM; Shimadzu; QP-PLUS-2010) nas seguintes condições: coluna capilar de 30m e 0,25mm de diâmetro interno (Rtx-5MS); hélio como gás de arraste; temperatura do injetor e do detector de 220 e 300 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi a mesma descrita para a análise realizada em CG-DIC. Os espectros obtidos foram comparados com informação disponível na biblioteca do aparelho (Wiley 7), com dados da literatura e com o valor do índice de Kovats (ADAMS, 2007).

2.3. Testes *in vitro*

2.3.1. Ensaio de atividade antifúngica

O fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, raça 3, foi obtido a partir do banco de fungos do Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Plantas Agrícolas e Florestais (LEMP) da Universidade Federal do Espírito Santo. Por ser o constituinte majoritário e ter atividade antifúngica comprovada em testes *in vitro* (VIANA, 2013), o carvacrol foi utilizado nos testes biológicos. Inicialmente foi realizado o teste de difusão em disco (NCCLS, 1997) para avaliar o efeito de soluções do OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol a 200, 400, 600, 800 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, solubilizadas em DMSO (0,2% v v⁻¹), Tween 80® (0,001% m v⁻¹), o fungicida comercial contendo tiabendazol (4.130 $\mu\text{g mL}^{-1}$) na concentração recomendada para uso (controle positivo) e uma testemunha contendo BDA e os solubilizantes (controle negativo) sobre *Fusarium oxysporum*, com 5 repetições cada, sendo uma placa por repetição. As soluções foram adicionadas em meio BDA fundente e transferidas para câmara de crescimento de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) ($25 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas) por oito dias. Em seguida foi avaliado o crescimento micelial (CM) para cada um dos tratamentos (ALFENAS, A. C.; MAFIA, 2007; SHARMA et al., 2017; TANAKA, 1987). Os discos referentes às concentrações que inibiram 100 % do crescimento micelial foram transferidos para placas em meio BDA fundente e incubadas em BOD, nas mesmas condições descritas acima. Após o período de incubação, observou-se se houve ou não crescimento micelial, verificando assim o efeito fungicida ou fungistático do OE de *O. vulgare* L. e do carvacrol.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), realizou-se outro teste utilizando o OE de *O. vulgare* L. (50, 85, 140, 240 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o carvacrol (50, 70, 100, 140 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o controle negativo e o controle positivo, conforme descrito anteriormente. Os valores de PIC foram obtidos pela seguinte equação:

$$\text{PIC} = ((\text{CM ctrl neg} - \text{CM tratamento}) \div (\text{CM ctrl neg})) \times 100$$

CM ctrl neg: crescimento micelial do controle negativo; CM_{tratamento}: crescimento micelial de cada tratamento (BAMPI et al., 2013; TAVARES; SOUZA, 2005). A partir

dos resultados obtidos foram determinados os valores de CE_{50} e CE_{100} para o OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol.

2.3.2. Avaliação do efeito fitotóxico

Os valores de concentração das emulsões do OE de *O. vulgare* L. e do carvacrol utilizados para avaliar o efeito fitotóxico sobre sementes de tomate foram determinados por escala logarítmica, a partir dos parâmetros CE_{50} e CE_{100} . Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições de 25 sementes (BRASIL, 2009). As amostras de 100 sementes de tomateiro foram colocadas em sacos plásticos (15 min.) contendo 1 mL de cada um dos tratamentos: carvacrol a 30, 47, 63, 115 e 116 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e OE de *O. vulgare* a 70, 105, 140, 235 e 325 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e controle negativo (água de osmose reversa autoclavada). Os solubilizantes (DMSO a 0,2% v v⁻¹; Tween 80 a 0,001% m v⁻¹) não apresentaram efeito fitotóxico *in vitro* sobre sementes de tomates (dados não mostrados). Na sequência, as sementes foram secas à temperatura ambiente por 24 horas ao ar livre (ORDOÑEZ LOZADA, 2016). As sementes, de cada repetição, foram colocadas para germinar em placas de Petri revestidas com três folhas de papel germitest, duas no fundo da placa e uma sobre as sementes. Em seguida, foi adicionada água de osmose reversa na quantidade equivalente a três vezes o peso do papel. Posteriormente, as sementes foram incubadas em BOD a 25 °C. As avaliações da germinação foram realizadas no 5° e 14° dia de incubação em relação aos parâmetros: porcentagem de plântulas normais (PN), porcentagem de germinação no 14° dia (G), crescimento radicular (CR) e parte aérea (CPA) e índice de velocidade de germinação (IVG) (BRASIL, 2009; FANTAZZINI et al., 2016). Para o cálculo do IVG foi contabilizado diariamente o número de sementes germinadas. Durante esse período de avaliação, foi anotada a quantidade de sementes que germinou a cada dia. O IVG foi calculado (MAGUIRE, 1962): $IVG: \frac{G_1+G_2+\dots+G_n}{N_1+N_2+\dots+N_n}$, em que G_1, G_2, \dots, G_n é igual ao número de sementes germinadas e N_1, N_2, \dots, N_n igual ao número de dias de semeadura.

2.4. Efeito *in vivo* na incidência de murcha de Fusarium

2.4.1. Tratamento das sementes

As sementes foram tratadas com OE de *O. vulgare* L. e carvacrol a 100, 200, 400, 600 e 1.200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO e Tween e com o fungicida tiabendazol (1.300 $\mu\text{g mL}^{-1}$: dose recomendada para o tratamento de sementes de tomateiro) seguindo o mesmo procedimento descrito no item 2.3.2 (ORDOÑEZ LOZADA, 2016). O experimento foi montado em DIC em esquema fatorial (2 x 5) com quatro repetições cada, sendo cada repetição composta por 25 sementes. O fator 1 foi composto por dois níveis (OE de *O. vulgare* L. e carvacrol.). O fator 2 (concentração) foi composto por cinco níveis (100, 200, 400, 600 e 1.200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os tratamentos adicionais foram: controle negativo (água de osmose reversa autoclavada) sem a presença do patógeno; controle negativo com o patógeno, e; controle positivo com fungicida comercial e com patógeno.

2.4.2 Infestação do solo com patógeno

Quatorze dias antes da semeadura foi realizada a inoculação do patógeno *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* em grãos de milho (KLINGELFUSS; YORINORI; DESTRO, 2007). Os grãos de milho foram embebidos em água (12 h) e, em seguida, a água foi retirada e os grãos de milho foram partidos manualmente em quatro partes com o auxílio de uma faca. Os pedaços de milho (150 cm^3) foram depositados em frascos erlenmeyers (250 mL) e autoclavados por duas vezes em intervalo de 24 horas. Após a esterilização, 10 discos de micélio do fitopatógeno foram adicionados dentro dos erlenmeyers. Posteriormente, os frascos foram vedados e incubados em BOD (25 °C; fotoperíodo de 12 horas; 14 dias) e agitados manualmente durante esse período.

Para a infestação de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* no solo foi utilizada a metodologia descrita por Kligelfus et al. (2007) com adaptações. Em bandejas de plástico com 128 células, foi adicionado substrato organomineral até a metade do seu volume. Posteriormente, em cada célula da bandeja, foi depositado um fragmento de milho colonizado com *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e coberto com substrato. Para

cada célula referente a um dos respectivos tratamentos descritos no item 2.4.1 foi depositada uma semente de tomateiro.

2.4.3. Avaliação

Foram realizadas avaliações diárias durante 14 dias após a semeadura para avaliar o índice de velocidade de emergência de plântulas (IVE), proposto por Ferreira et al. (2013) e calculado seguindo a fórmula descrita por Maguire (1962). No 26º dia após a semeadura, quando as plântulas estavam no estágio de desenvolvimento recomendado para transplântio (AMINI, J.& SIDOVICH, 2010), foram avaliadas a incidência da doença no último dia (ID) e a altura das mudas (FERREIRA et al., 2013). Para calcular os valores da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), foram realizadas contagens diárias a partir do momento em que as plântulas apresentaram sintomas da doença. Essas avaliações foram iniciadas no 18º dia e encerradas no 26º após a semeadura. Os valores para a incidência da doença em cada dia de avaliação foram utilizados para o cálculo da AACPD (SHANER; FINNEY, 1977).

2.5. Análise estatística

Para determinar as diferenças significativas entre os tratamentos, estes foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% ($p \leq 0,05$) de probabilidade. Os níveis do fator quantitativo (concentrações) foram avaliados por regressão linear e os níveis do fator qualitativo (OE de *O. vulgare* L. e carvacrol) foram comparados com o Teste F ($p \leq 0,05$) e Scott-Knott ($p \leq 0,05$), com auxílio do programa estatístico SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização química do óleo essencial

Na composição química do OE de *Origanum vulgare* L. foram observados 14 compostos cujos teores variaram entre 0,21 e 67,67% (Tabela 1).

Tabela 1: Tempo de retenção (T_R), valores de índice de Kovats tabelado (IK_{tab}) e calculado (IK_{cal}) e porcentagem em área (%) dos constituintes químicos do óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

Constituintes	T_R (min.)	IK_{cal}	IK_{tab}	Área (%)
Monoterpenos Hidrocarbonetos				
α -tujeno	8,67	926	931	0,62
α -pineno	8,91	932	939	1,52
Canfeno	9,51	947	953	0,35
β -pineno	10,76	973	980	0,35
β -mirceno	11,58	989	991	1,45
β -careno	12,67	1012	1011	0,91
o-cimeno	13,09	1022	1022	11,60
γ -terpineno	14,76	1058	1062	7,45
Subtotal				23,67
Monoterpenos Oxigenados				
Linalol	16,83	1097	1098	2,42
Timol-metil éster	23,79	1241	1235	0,21
Timol	26,23	1290	1290	3,91
Carvacrol	26,88	1304	1298	67,67
Subtotal				74,21
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos				
<i>trans</i> -cariofileno	31,66	1413	1418	1,30
Subtotal				1,30
Sesquiterpenos Oxigenados				
Óxido de cariofileno	38,51	1576	1581	0,25
Subtotal				0,25
Total				100

O constituinte químico encontrado em maior proporção no OE de *O. vulgare* L. foi o carvacrol (67,67%), seguido pelo o-cimeno (11,6%), terpineno (7,45%) e timol (3,91%). Diferenças em relação ao teor ou à composição química do OE podem ocorrer por fatores de origem biótica, abiótica, genética ou técnica (coleta, estabilização e armazenamento) (MORAIS, 2009; TEIXEIRA et al., 2013; VIANA, 2013). A análise cromatográfica do carvacrol comercial revelou a presença de único pico (IK_{cal} = 1304; T_R = 26,88 min) referente ao carvacrol.

3.2. Efeito antifúngico *in vitro*

O OE de *O. vulgare* L e carvacrol inibiram 100% do crescimento micelial (CM) do *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* nas concentrações de 400 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O contato com o OE provoca um aumento no potencial de membrana da célula fúngica, o que interrompe a produção de adenosina trifosfato (ATP), causando a granulação do citoplasma, rompimento da membrana e inibição das funções enzimáticas dos fungos (PURKAYASTHA, 1995; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005; HILLEN et al., 2012), inibindo seu desenvolvimento.

O efeito fungicida sobre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* foi comprovado para o OE de *O. vulgare* L. em valores de concentrações superiores a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em contrapartida, o carvacrol apresentou efeito fungistático para todas as concentrações testadas (200-1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Viana (2013) descreveu a atividade fungicida do OE *O. vulgare* L. contra *F. oxysporum* (128, 256, 512 e 1.024 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no qual obteve 67% de inibição do CM na concentração de 1.024 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todavia, os testes realizados no presente trabalho demonstraram que a concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi suficiente para inibir 100% do CM do patógeno e ser fungicida enquanto que nos testes realizados por Viana foram necessários 1.024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para que os resultados fossem fungicidas.

Com base nos resultados dos testes realizados com novas concentrações para o OE de *O. vulgare* L. (50 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e carvacrol (50 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foram calculados os valores da concentração mínima efetiva para inibir 50 e 100% (CE_{50} e CE_{100}) (Tabela 2).

Tabela 2: Modelos de equações de regressão linear obtidos a partir da avaliação do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e carvacrol contra o crescimento micelial *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* em meio BDA.

Tratamento	Equação de Regressão	R ²	CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE ₁₀₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>O. vulgare</i> L.	$\hat{Y} = 0,264912x + 14,350902$	0,74	134,5	323
Carvacrol	$\hat{Y} = 0,4838x + 19,688$	0,84	62,6	166

CE: concentração mínima efetiva para inibir 50 e 100 % do crescimento micelial do patógeno

Nota-se que a concentração mínima para inibir 100% (CE_{100}) do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* para o OE de *O. vulgare* L. foi de $323 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para o carvacrol $166 \mu\text{g mL}^{-1}$. Daferera et al. (2003), testaram OE de *O. vulgare* L. a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ e obtiveram 100% de inibição do crescimento micelial de outras duas espécies de *Fusarium* (*Fusarium solani* var. *coerleum* e *F. sulphureum*) *in vitro*. Essa variação nos valores de CE pode estar relacionada com a composição química do OE e o agente fitopatogênico.

3.3. Avaliação do efeito fitotóxico

Para as variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA), houve ajuste ao modelo de análise de regressão, entretanto, o OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol não apresentaram efeito fitotóxico nas sementes e nas plântulas de tomateiro (Apêndices C e D).

As variáveis porcentagem de plântulas normais (PN) e porcentagem de geminação no 5º e 14º dia (PC e G) de plântulas de tomateiro, em função do aumento da concentração do OE de *O. vulgare* L. e carvacrol, não apresentaram diferença estatística significativa (Apêndice C), ou seja, as concentrações não foram fitotóxicas tanto para o OE quanto para o carvacrol em relação à testemunha. Tratamentos de sementes realizados com outros OEs (*Eremanthus erythropappus*, *Cymbopogon martinii* e de *Rosmarinus officinalis*) foram testados por Hillen et al. (2012), trabalho no qual os autores concluíram que não houve efeito fitotóxico no processo germinativo e o número de plântulas assintomáticas foi menor.

3.4. Controle da murcha de *Fusarium* em plântulas de tomateiro com o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e carvacrol

Houve diferença significativa entre as concentrações do OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol para as variáveis AACPD e altura das plântulas de tomateiro em relação ao fungicida comercial (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do tratamento de sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) com óleo essencial de *Origanum vulgare* L., carvacrol e o fungicida comercial (tiabendazol) na redução da incidência da murcha de Fusarium e altura das plântulas.

TRAT	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AACPD	Altura (cm)
SP*	0	0 c	4,27 \pm 0,23 b
CP**	0	64,32 \pm 28,24 a	6 \pm 0,89 a
<i>O. vulgare</i> L.	100	26,65 \pm 24,70 c	6,44 \pm 0,89 a
	200	49,44 \pm 20,90 b	6,43 \pm 0,80 a
	400	41,29 \pm 11,30 b	5,59 \pm 0,48 a
	600	35,26 \pm 32,02 b	5,94 \pm 0,77 a
	1.200	19,56 \pm 12,79 c	6,44 \pm 1,03 a
carvacrol	100	25,42 \pm 28,95 c	5,95 \pm 0,53 a
	200	39,93 \pm 16,39 b	5,50 \pm 0,74 a
	400	20,13 \pm 26,00 c	6,30 \pm 1,14 a
	600	64,00 \pm 37,06 a	6,19 \pm 1,08 a
	1.200	34,60 \pm 8,16 b	7,00 \pm 0,70 a
Fungicida	1.312	38,03 \pm 16,82b	6,31 \pm 0,70 a
CV (%)		49,39	9,58

*SP: solo sem patógeno; **CP: solo com patógeno; AACPD: área abaixo da curva de progresso da doença; Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0.05$). Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si.

Percebe-se que para os valores de AACPD as concentrações de 100 e 1.200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o OE de *O. vulgare* L. e 100 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o carvacrol foram eficientes no controle da doença ao longo do tempo, pois tiveram os menores valores de incidência comparados a testemunha sem a presença do patógeno (SP). Assim, pode-se dizer que o OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol se comportaram melhor ou igual ao fungicida comercial em concentrações menores que o mesmo.

Não houve interação entre os fatores qualitativos (OE de *O. vulgare* L. e carvacrol) para as variáveis índice velocidade de emergência (IVE), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e altura das plântulas (Apêndice E), ou seja, tanto o OE quanto seu constituinte majoritário surtem o mesmo efeito no controle da doença. Todavia, houve interação entre os fatores quantitativos (concentrações) apenas para a variável AACPD (Figura 1).

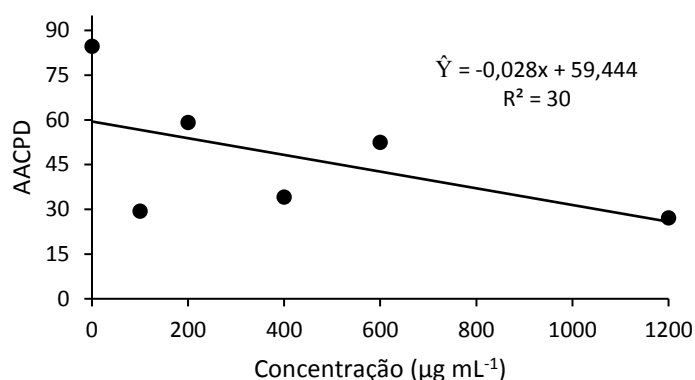


Figura 1: Efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e do carvacrol na redução da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plântulas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.).

A concentração de 1.200 µg mL⁻¹ foi a mais eficiente no controle, sendo capaz de reduzir 68% da AACPD para o OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol em relação a testemunha (100%). No valor de concentração de 1.200 µg mL⁻¹ não foi observada a ocorrência de fitotoxicidade nas mudas de tomateiro.

No teste dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Cymbopogon citratus* para o controle de *Fusarium moniliforme*, transmitido via sementes, Tagne et al. (2013) observaram que esses óleos, nas concentrações de 1%, 2%, 3% (10.000, 20.000 e 30.000 µg mL⁻¹) para o *C. citratus* e 7%, 5%, 10% (70.000, 50.000 e 10.000 µg mL⁻¹) para *O. gratissimum*, controlaram 90% da doença nas quatro cultivares de milho testadas. Todavia, vale ressaltar que as concentrações utilizadas por Tagne et al. foram superiores às descritas neste trabalho.

OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol não foram fitotóxicos às sementes nem às plântulas e reduziram a incidência da murcha de *Fusarium* 68% para AACPD. As concentrações testadas neste trabalho foram menores que a concentração do fungicida, todavia os tratamentos com OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol demonstraram eficiência igual ou superior ao do fungicida comercial. Portanto, o OE de *O. vulgare* L. e o carvacrol apresentam potencial como uma alternativa para o manejo integrado da murcha de *Fusarium* em mudas de tomateiro. Dessa maneira, a descoberta de princípios ativos de origem natural e renovável, que não sejam fitotóxicos às sementes nem às plântulas, pode auxiliar no manejo integrado de doenças de plantas contra fitopatógenos.

3. Referências

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream/ USA: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. UFV ed. Viçosa: [s.n.].
- AMINI, J.& SIDOVICH, D. . The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, p. 172–178, 2010.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 5º ed. [s.l.] Agronômica Ceres, 2016.
- BAMPI, D. et al. Sensibilidade de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas. v. 29, n. 4, p. 787–795, 2013.
- BARBOZA, E. A. et al. Identification of *Fusarium* f. sp. *lycopersici* Race 3 Infecting Tomatoes in Northeast Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 3, p. 422–422, 7 mar. 2013.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Mapa/ACS ed. Brasília: [s.n.].
- DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.
- DU TOIT, J. L. **Gestão de doenças em culturas de sementes, na Enciclopédia de Culturas de Plantas e Culturas**. Goodman R. ed. New York: [s.n.].
- FANTAZZINI, T. B. et al. *Fusarium verticillioides* inoculum potential and its relation with the physiological stored corn seeds quality. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 5, p. 1254–1262, 6 out. 2016.
- FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and Statistics**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#compare>>. Acesso em: 23 mar. 2018.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, dez. 2011.
- FERREIRA, R. L. et al. Temperatura inicial de germinação no desempenho de plântulas e mudas de tomate. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1189–1195, jul. 2013.
- GOGGI, A. S. et al. Integration of natural seed treatments in organic and open-pollinated corn systems. **Leopold Center Completed Grant Reports**, p. 295, 1 jan. 2008.
- HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns

fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439–445, 2012.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.** Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2017/lspa_201701.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2018.

JAAFARI, A. et al. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 477–491, dez. 2007.

KLINGELFUSS, L. H.; YORINORI, J. T.; DESTRO, D. Métodos de Inoculação para Quantificação de Resistência em Soja a *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em Casa-de-Vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, 2007.

KOTAN, R. et al. Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. **Scientia Horticulturae**, v. 153, p. 34–41, 4 abr. 2013.

LA TORRE, A. et al. Using plant essential oils to control *Fusarium* wilt in tomato plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 3, p. 487–496, 13 mar. 2016.

MAGUIRE, J. D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor1. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176, 20 nov. 1962.

MANCINI, V.; ROMANAZZI, G. Seed treatments to control seedborne fungal pathogens of vegetable crops. **Pest Management Science**, v. 70, n. 6, p. 860–868, 1 jun. 2014.

MORAIS, L. A. S. INFLUÊNCIA DOS FATORES ABIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved standard M7-A4, PA**, v. 24, p. 114–121, 1997.

ORDOÑEZ LOZADA, M. I. Eficiência de óleos essenciais para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* em sementes de cebola e seu efeito na qualidade fisiológica. 30 maio 2016.

PINTO, E. et al. In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 2, p. 135–141, 1 ago. 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 6408, p. 1051–1056, 1977.

SHARMA, A. et al. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential

oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 308–313, 1 mar. 2017.

TAGNE, A. et al. Fungicides and essential oils for controlling maize seed-borne *Fusarium moniliforme* and its transmission into seedlings. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 3, p. 290-297, 2013.

TANAKA, M. A. S. **Técnicas auxiliares em laboratório de patologia de sementes**. Fundação C ed. São Paulo: [s.n.].

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. DE. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 52–59, fev. 2005.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2707–2714, 30 ago. 2013.

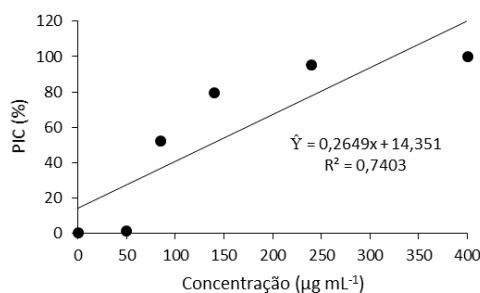
TOMAZONI, E. Z. et al. In vitro and in vivo activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 72–77, 15 set. 2017.

VIANA, W. P. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* Linneus (*O. vulgare* L.) sobre fungos oportunistas do gênero *Fusarium***. Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. [s.l.] UFP, 18 jan. 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de variância do óleo essencial de *O. vulgare* L. para a variável porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC).

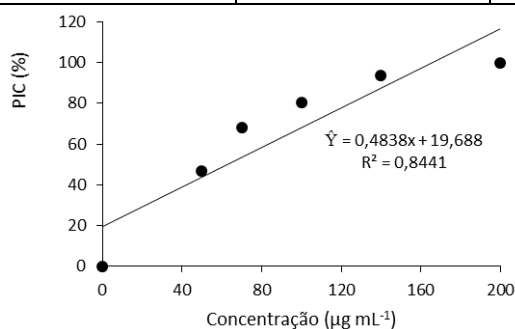
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PIC (O. vulgare L.)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	50897.975000	10179.595000	296.601	0.0000
Erro	24	823.700000	34.320833		
Total corrigido	29	51721.675000			
CV (%) =	10.70				
Média geral:	54.7500000	Número de observações:		30	
REGRESSÃO					
Média harmônica do número de repetições (r): 5					
Erro padrão de cada média dessa FV: 2,82616937449498					
MODELO LINEAR					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	14.350902	1.62189954	8.848	0.0000	
b1	0.264912	0.00799497	33.135	0.0000	
R^2 = 74.03%					
MODELO QUADRÁTICO					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	-9.219874	2.16294086	-4.263	0.0003	
b1	0.724783	0.02904126	24.957	0.0000	
b2	-0.001131	0.00006868	-16.472	0.0000	
R^2 = 92.33%					
SOMAS DE QUADRADOS SEQUENCIAIS - TIPO I (TYPE I)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
b1	1	37681.430709	37681.430709	1097.917	0.000
b2	1	9311.670057	9311.670057	271.312	0.000
Desvio	3	3904.874233	1301.624744	37.925	0.000
Erro	24	823.700000	34.320833		



Porcentagem de inibição de Crescimento micelial (PIC) para o óleo essencial de *O. vulgare* L..

APÊNDICE B – Análise de variância do carvacrol para a variável porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PIC					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	34285.664000	6857.132800	171.702	0.0000
Erro	24	9.58.468000	39.936167		
Total corrigido	29	35244.132000			
CV (%) =	9.75				
Média geral:	64.8400000	Número de observações:		30	
Média geral:	34.7581200	Número de observações:		24	
REGRESSÃO					
Média harmônica do número de repetições (r): 5					
Erro padrão de cada média dessa FV: 2,82616937449498					
MODELO LINEAR					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	19.688302	2.03576010	9.671	0.0000	
b1	0.483768	0.01797036	26.920	0.0000	
R^2 = 84.41%					
MODELO QUADRÁTICO					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	0.427703	2.64526157	0.162	0.8729	
b1	1.122147	0.05879773	19.085	0.0000	
b2	-0.003142	0.00027554	-11.403	0.0000	
R^2 = 99.56%					
SOMAS DE QUADRADOS SEQUENCIAIS - TIPO I (TYPE I)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
b1	1	28941.915978	28941.915978	724.704	0.000
b2	1	5192.667754	5192.667754	130.024	0.000
Desvio	3	151.080268	50.360089	1.261	0.310
Erro	24	958.468000	39.936167		



Porcentagem de inibição de Crescimento micelial (PIC) para o carvacrol

APÊNDICE C - Análise de variância do óleo essencial de *O. vulgare* L. para as variáveis primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G), número de plântulas normais (PN), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA).

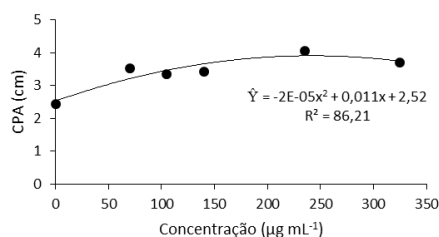
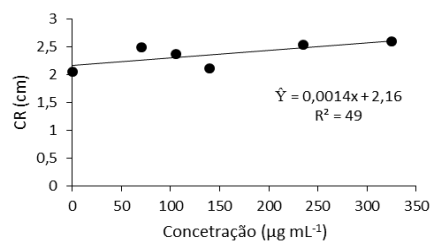
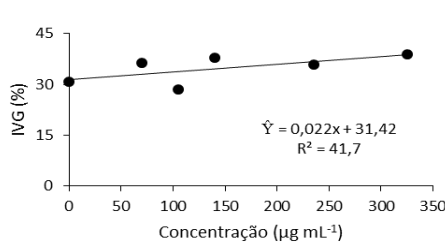
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PC					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	2432.000000	486.400000	1.535	0.2287
Erro	18	5704.000000	316.888889		
Total corrigido	23	8136.000000			
CV (%) =	21.45				
Média geral:	83.0000000	Número de observações:		24	
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA G					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	814.000000	162.800000	1.248	0.3283
Erro	18	2348.000000	130.444444		
Total corrigido	23	3162.000000			
CV (%) =	12.62				
Média geral:	90.5000000	Número de observações:		24	
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PN					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	1071.875000	214.375000	0.834	0.5427
Erro	18	4628.750000	257.152778		
Total corrigido	23	5700.625000			
CV (%) =	20.53				
Média geral:	78.1250000	Número de observações:		24	
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA IVG					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	344.799077	68.959815	3.488	0.0223
Erro	18	355.875656	19.770870		
Total corrigido	23	700.674733			
CV (%) =	12.79				
Média geral:	34.7581200	Número de observações:		24	
REGRESSÃO					
Média harmônica do número de repetições (r): 4					
Erro padrão de cada média dessa FV: 2,22322230958528					
MODELO LINEAR					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	31.424105	1.53372756	20.489	0.0000	
b1	0.022862	0.00847775	2.697	0.0148	
R^2 = 41.70%					
MODELO QUADRÁTICO					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	31.296168	2.04783332	15.283	0.0000	
b1	0.025550	0.02974192	0.859	0.4016	
b2	-0.000008	0.00008557	-0.094	0.9259	
R^2 = 41.75%					
SOMAS DE QUADRADOS SEQUENCIAIS - TIPO I (TYPE I)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
b1	1	143.775783	143.775783	7.272	0.015
b2	1	0.175749	0.175749	0.009	0.926
Desvio	3	200.847546	66.949182	3.386	0.041
Erro	18	355.875656	19.770870		

APÊNDICE C - Análise de variância do óleo essencial de *O. vulgare* L. para as variáveis primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G), número de plântulas normais (PN), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA) (Continuação).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA CR					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	2.502483	0.500497	3.900	0.0143
Erro	18	2.309850	0.128325		
Total corrigido	23	4.812333			
CV (%) =	15.69				
Média geral:	2.2833333	Número de observações:		24	
REGRESSÃO					
Média harmônica do número de repetições (r): 4					
Erro padrão de cada média dessa FV: 0,17911239488098					
MODELO LINEAR					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	2.022645	0.12356372	16.369	0.0000	
b1	0.001788	0.00068300	2.617	0.0175	
R^2 = 35.13%					
MODELO QUADRÁTICO					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	2.015852	0.16498230	12.219	0.0000	
b1	0.001930	0.00239614	0.806	0.4310	
b2	-0.000000	0.00000689	-0.062	0.9511	
R^2 = 41.75%					
SOMAS DE QUADRADOS SEQUENCIAIS - TIPO I (TYPE I)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
b1	1	0.879012	0.879012	6.850	0.017
b2	1	0.000495	0.000495	0.004	0.915
Desvio	3	1.622975	0.540992	4.216	0.020
Erro	18	2.309850	0.128325		

APÊNDICE C - Análise de variância do óleo essencial de *O. vulgare* L. para as variáveis primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G), número de plântulas normais (PN), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA) (Continuação).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA CPA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	5.837333	1.167467	5.581	0.0028
Erro	18	3.765400	0.209189		
Total corrigido	23	9.602733			
CV (%) =	13.35				
Média geral:	3.4266667	Número de observações:		24	
REGRESSÃO					
Média harmônica do número de repetições (r): 4					
Erro padrão de cada média dessa FV: 0,228685859252867					
MODELO LINEAR					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	2.905528	0.15776281	18.417	0.0000	
b1	0.003574	0.00087204	4.098	0.0007	
R^2 = 60.18%					
MODELO QUADRÁTICO					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	2.529741	0.21064494	12.010	0.0000	
b1	0.011468	0.00305932	3.749	0.0015	
b2	-0.000024	0.00000880	-2.692	0.0149	
R^2 = 86.15%					
SOMAS DE QUADRADOS SEQUENCIAIS - TIPO I (TYPE I)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
b1	1	3.512833	3.512833	16.793	0.001
b2	1	1.516296	1.516296	7.248	0.015
Desvio	3	0.808205	0.269402	1.288	0.309
Erro	18	3.765400	0.209189		

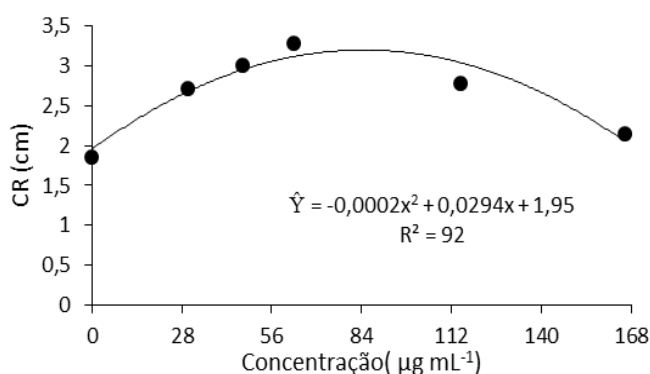


APÊNDICE D - Análise de variância do carvacrol para as variáveis primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G), número de plântulas normais (PN), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PC					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	141.3333333	28.266667	0.263	0.9275
Erro	18	1936.000000	107.55556		
Total corrigido	23	2077.333333			
CV (%) =	11.83				
Média geral:	87.6666667	Número de observações:		24	
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA G					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	32.000000	6.400000	0.094	0.9921
Erro	18	1224.000000	68.000000		
Total corrigido	23	1256.000000			
CV (%) =	8.87				
Média geral:	93.0000000	Número de observações:		24	
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PN					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	189.333333	37.866667	0.110	0.9887
Erro	18	6200.000000	344.444444		
Total corrigido	23	6389.333333			
CV (%) =	24.00				
Média geral:	77.3333333	Número de observações:		24	
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA IVG					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	138.260033	27.652007	2.281	0.0900
Erro	18	218.173833	12.120768		
Total corrigido	23	356.433866			
CV (%) =	9.87				
Média geral:	35.2761058	Número de observações:		24	

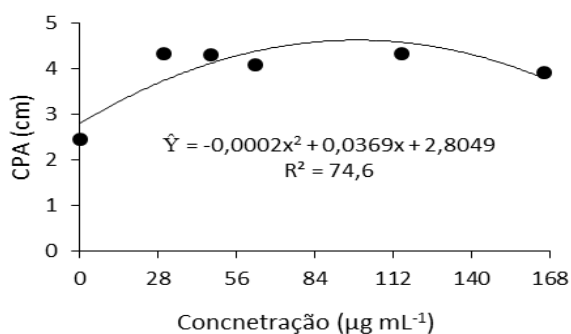
APÊNDICE D - Análise de variância do carvacrol para as variáveis primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G), número de plântulas normais (PN), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA) (Continuação).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA CR					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	5.656733	1.131347	3.533	0.0212
Erro	18	5.763800	0.320211		
Total corrigido	23	11.420533			
CV (%) =	21.45				
Média geral:	2.6366667	Número de observações:		24	
REGRESSÃO					
Média harmônica do número de repetições (r): 4					
Erro padrão de cada média dessa FV: 0,282935995903275					
MODELO LINEAR					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	2.647561	0.18670050	14.181	0.0000	
b1	-0.00155	0.00209045	-0.074	0.9416	
R^2 = 0.03%					
MODELO QUADRÁTICO					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	1.961020	0.25293485	7.753	0.0000	
b1	0.029307	0.00761555	3.848	0.0012	
b2	-0.000173	0.00004302	-4.023	0.0008	
R^2 = 91.66%					
SOMAS DE QUADRADOS SEQUENCIAIS - TIPO I (TYPE I)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
b1	1	0.001766	0.001766	0.006	0.942
b2	1	5.183140	5.183140	16.187	0.001
Desvio	3	0.471827	0.157276	0.419	0.693
Erro	18	5.763800	0.320211		



APÊNDICE D - Análise de variância do carvacrol para as variáveis primeira contagem (PC), porcentagem de germinação (G), número de plântulas normais (PN), índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento radicular e da parte aérea (CR e CPA) (Continuação).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA CPA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONC	5	10.730971	2.146194	6.224	0.0016
Erro	18	6.207325	0.344851		
Total corrigido	23	16.938296			
CV (%) =	15.02				
Média geral:	3.9104167	Número de observações:		24	
REGRESSÃO					
Média harmônica do número de repetições (r): 4					
Erro padrão de cada média dessa FV: 0,293620243209187					
MODELO LINEAR					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	3.544126	0.19375070	17.318	0.0000	
b1	0.005220	0.00216939	2.406	0.0271	
R^2 = 18.61%					
MODELO QUADRÁTICO					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	2.804940	0.26248619	10.686	0.0000	
b1	0.036942	0.00790312	4.674	0.0002	
b2	-0.000186	0.00004465	-4.174	0.0006	
R^2 = 74.60%					
SOMAS DE QUADRADOS SEQUENCIAIS - TIPO I (TYPE I)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
b1	1	1.996856	1.996856	5.790	0.027
b2	1	6.008535	6.008535	17.424	0.001
Desvio	3	2.725580	0.908527	2.635	0.081
Erro	18	6.207325	0.344851		



APÊNDICE E - Análise de variância para o óleo essencial de *O. vulgare* L. e o carvacrol para as variáveis, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice de velocidade de emergência (IVE) e altura das plântulas.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA AACPD					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
OLEO	1	1208	1208.2	1.0640	0.30918
CONC	5	19723	3944.6	3.4741	0.01155
OLEO*CONC	5	3847	769.5	0.6777	0.64312
Erro	36	40876	1135.4		
Total corrigido	47	65655			
CV (%) =	70.53%				
REGRESSÃO					
MODELO LINEAR					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	59.4440545	1.31134	8.48320	0.0000	
b1	-0.0280013	0.01211	-2.31287	0.02656	
R ² = 30.79%					
MODELO QUADRÁTICO					
Parâmetro	Estimativa	SE	t para H0: Par=0	Pr> t	
b0	63.70881249	9.17506	6.94370	0.00000	
b1	-0.05811073	0.04353	-1.33487	0.19030	
b2	0.00002472	0.00003	0.72005	0.47614	
R ² = 33.78%					
SOMAS DE QUADRADOS SEQUENCIAIS - TIPO I (TYPE I)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
b1	1	6073.9489	6073.9489	5.35	0.02656
b2	1	588.7041	588.7041	0.52	0.47614
Desvio	3	13060.4109	4353.4703	3.83	0.01761
Erro	36	40876.1048	1135.4473		
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ALTURA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
OLEO	1	0.006	0.00588	0.00803	0.92910
CONC	5	3.665	0.73304	1.00062	0.43137
OLEO*CONC	5	4.526	0.90526	1.23571	0.31280
Erro	36	26.373	0.73259		
Total corrigido	47	34.570			
CV (%) =	13.87%				
TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA IVE					
FV	GL	SQ	QM	Fc	
OLEO	1	0.356	0.3556	0.12102	
CONC	5	20.902	4.1804	1.42282	
OLEO*CONC	5	18.209	3.6418	1.23949	
Erro	36	105.773	2.9381		
Total corrigido	47	145.239			
CV (%) =	6.75%				